

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-21778

(43) 公開日 平成9年(1997)1月21日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/327			G 0 1 N 27/30	3 5 3 R
27/28	3 3 1		27/28	3 3 1 Z
			27/30	3 5 3 Z

審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平7-194114

(22) 出願日 平成7年(1995)7月7日

(71) 出願人 000001443

カシオ計算機株式会社

東京都新宿区西新宿2丁目6番1号

(71) 出願人 591010619

輕部 征夫

神奈川県川崎市宮前区東有馬1-3-16

(72) 発明者 当山 忠久

東京都八王子市石川町2951番地の5 カシオ計算機株式会社八王子研究所内

(72) 発明者 輕部 征夫

神奈川県川崎市宮前区東有馬1-13-16

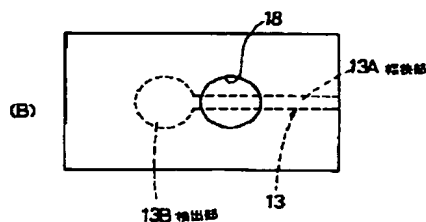
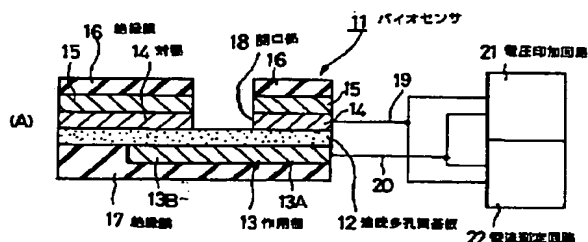
(74) 代理人 弁理士 杉村 次郎

(54) 【発明の名称】 バイオセンサ

(57) 【要約】

【課題】 被検査液が微量でも迅速に基質濃度の測定ができ、且つ小型化を図ることができるようにする。

【解決手段】 酵素が固定化された連続多孔質基板12の一方の表面に作用極13を設け、他方の表面に対極14を設けると共に、対極14側に開口部18を形成する。また、対極14の外側表面には基板15と絶縁膜16とが順次形成されている。作用極13と連続多孔質基板12の一方の表面側には全面に絶縁膜17が形成されている。開口部18から導入された被検査液は、速やかに連続多孔質基板12介して作用極13と対極14との間に浸透して基質濃度の測定が可能となる。



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 相対向する一対の電極のうち一方の電極の対向内側面に、酵素あるいは酵素とメディエータとが固定化された連続多孔質層が設けられ、他方の電極側に前記酵素と反応を生じる被検査液が前記連続多孔質層に導通する開口部を形成したことを特徴とするバイオセンサ。

【請求項2】 前記他方の電極と前記連続多孔質層との間に、前記開口部と連通して被検査液が導入される間隙が形成されていることを特徴とする請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項3】 前記一対の電極の対向外側面に絶縁層が設けられ、前記開口部は、前記絶縁層を貫通してなることを特徴とする請求項1または請求項2記載のバイオセンサ。

【請求項4】 前記一対の電極と前記連続多孔質層とが可撓性を有し、前記絶縁層が可撓性および柔軟性を有することを特徴とする請求項1～請求項3のいずれかに記載のバイオセンサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、バイオセンサに関し、さらに詳しくは、各種液体の成分濃度を、固定化した酵素などを利用して測定する、臨床検査や水質検査などに用いられる酵素センサに係る。

【0002】

【従来の技術】従来、固定化した酵素を用いたバイオセンサとしては、図4に示すものが知られている。このバイオセンサは、絶縁基板1の一側表面に作用極2が設けられ、その他側表面に対極3が設けられている。そして、作用極2の表面には、固定化酵素膜4が被着されている。このような構成のバイオセンサは、被検査液の中にセンサ自体を浸して両電極間に被検査液が存在するようにして検査を行っている。このバイオセンサにおいては、グルコース酸化酵素の触媒作用により、グルコースが酸化されるときに消費される酸素の減少、またはこのとき生成される過酸化水素の増大を電流測定することにより、グルコース濃度を測定することができるようになっている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記した従来のバイオセンサにあっては、絶縁基板1により作用極2と対極3とが隔てられているため、バイオセンサを被検査液に浸けて両電極間を被検査液で満たすようにしなければならず、このためには相当量の被検査液が必要となる。このように、従来のバイオセンサでは、被検査液の微量測定ができないという問題点があった。この発明の課題は、小型化が図れると共に、被検査液が微量でも迅速に基質濃度の測定ができるようにすることである。

2

【0004】

【課題を解決するための手段】請求項1記載の発明は、相対向する一対の電極のうち一方の電極の対向内側面に、酵素あるいは酵素とメディエータとが固定化された連続多孔質層が設けられ、他方の電極側に前記酵素と反応を生じる被検査液が前記連続多孔質層に導通する開口部を形成したことを、特徴としている。請求項2記載の発明は、前記他方の電極と前記連続多孔質層との間に、前記開口部と連通して被検査液が導入される間隙が形成されていることを特徴としている。請求項3記載の発明は、前記一対の電極の対向外側面に絶縁層が設けられ、前記開口部は、前記絶縁層を貫通してなることを特徴としている。請求項4記載の発明は、前記一対の電極と前記連続多孔質層とが可撓性を有し、前記絶縁層が可撓性および柔軟性を有することを特徴としている。

【0005】請求項1記載の発明においては、他方の電極側に形成された開口部から被検査液を導通することができる。開口部から導通された被検査液は、連続多孔質層内の連続孔に染み込む。この連続多孔質層には、酵素が固定化されているため、被検査液は確実に酵素の触媒作用を受けて酵素反応を起こす。また、開口部から導入された被検査液は、相対向する一対の電極間の多孔質層を除く空隙を満たす量の被検査液があれば電極間に基質濃度に応じて電流を流すことが可能となる。なお、連続孔の径寸法を調節することにより、妨害物質となる例えばタンパク質などの高分子が一方の電極（作用極）に到達するのを防止することが可能となる。請求項2記載の発明においては、他方の電極と連続多孔質層との間に、開口部と連通して被検査液が導入される間隙が形成されているため、電極間に被検査液を速やかに介在させることができる。請求項3記載の発明においては、一対の電極の対向外側面に絶縁層が設けられているため、外部から電極に対して電氣的影響が及ぶのを防止することができる。また、開口部は、絶縁層を介しているため、絶縁層の外側から被検査液が容易に多孔質層まで導通できる。請求項4記載の発明においては、絶縁層が可撓性および柔軟性を有し、かつ一対の電極と連続多孔質層とが可撓性を有するため、例えばまぶたの下にセンサを挿入する場合や口のなかにセンサを挿入する場合などに、人体が損傷を受けるのを防止する作用がある。

【0006】

【発明の実施の形態】以下、この発明に係るバイオセンサの詳細を図面に示す実施形態に基づいて説明する。

（実施形態1）図1（A）および（B）は、この発明の実施形態1を示している。図1（A）に示すように、図中11はバイオセンサであり、このバイオセンサ11においては、例えばグルコースの酸化酵素であるグルコースオキシダーゼを固定化した連続多孔質基板12の、一方の表面に作用極13が設けられ、他方の表面に対極14が設けられている。なお、この連続多孔質基板12

は、例えばポリテトラフルオロエチレンなどのフッ素樹脂を連続多孔質構造にしたもので形成されている。また、この連続多孔質基板12内の表面にグルコースオキシダーゼを固定化するには、グルコースオキシダーゼを有機質膜に例えば架橋法や包括法などの周知の方法で固定化することができる。この場合、有機質膜が連続多孔質基板12の連続孔を閉塞させないために、例えば、連続多孔質基板12にエアーを供給しながら、グルコースオキシダーゼを含む有機質膜を連続孔内面に付着させるなどの方法を用いることができる。

【0007】そして、対極14の外側には絶縁性を有する基板15、絶縁膜16が順次形成されている。また、作用極13の外側にも、作用極13および連続多孔質基板12を覆う絶縁膜17が形成されている。なお、上記した基板15、絶縁膜16は、被検査液に対してぬれ性のよい材料で構成することが望ましい。そして、作用極13の形状は、図1(B)の平面図に示すように、細長い幅狭部13Aと、所定の面積を有する、円形状の検出部13Bとから構成されている。また、対極14は、後記する開口部18を除いて、連続多孔質基板12の他方の表面全体にわたって形成されている。そして、この対極14と、基板15と、絶縁膜16には、連続多孔質基板12を露出させる、被検査液を導入するための開口部18が貫通して形成されている。なお、この開口部18が形成された位置は、連続多孔質基板12の一方の表面に設けられた作用極13の検出部13Bに対して、平面的に見て隣接する位置に設定されている。そして、作用極13の幅狭部13Aの端縁部と、対極14とは、配線19、20を介して電圧印加回路21および電流測定回路22が接続されている。

【0008】本実施形態では、作用極13の幅狭部13Aと対極14との対向する面積が小さいため、実質的に検出部13Bと対極14との間に介在された被検査液中の基質濃度が測定されることになる。このように被検査液の基質濃度を測定する場合、検出部13Bと対極14との間には、平面的に見て検出部13Bに隣接する位置にある開口部18から被検査液が導入されるため、きわめて迅速に電極間に被検査液が微量でも十分に到達する。また、本実施形態のバイオセンサでは、電極どうしが対向した立体的な構造で、しかも電極間の距離を極めて短くすることができるため、装置の小型化を図ることができる。ところで、連続多孔質基板12の連続孔内では、被検査液が毛細管現象により保持されるため、電極間に被検査液を確実に介在させることができる。このため、電極間に被検出液が介在された状態で、被検出液中のグルコース濃度の測定が可能となる。さらに、本実施形態では、酵素を連続多孔質基板12の連続孔内の表面に固定化されているため、酵素と被検査液との接触面積が実質的に大きくなり酵素反応が効率的に行われ、測定効率を向上させることができる。また、連続多孔質基板12

の連続孔の径寸法を例えばタンパク質などの高分子が通過できないような径寸法に設定しておけば、基質濃度の測定に際して妨害物質となる高分子が作用極13に到達するのを防ぎ、固定化した酵素により発生した例えば過酸化水素を効率よく測定することが可能となる。

【0009】本実施形態のバイオセンサ11を用いて、グルコースを含む、例えば血液、尿、だ液、涙液、などの被検査液中のグルコースの濃度測定を行うには、まず、微量の被検査液を開口部18に滴下する。そして、被検査液が連続多孔質基板12の連続孔内に浸透すると、被検査液中のグルコースが、連続孔内に固定化されているグルコースオキシダーゼによって酸化され、一方グルコースオキシダーゼ自体は還元されて還元型となる。このとき、被検査液もしくは、被検査液とともに存在する液体などの中に酸素が存在していれば、酸素が電子受容体となり、還元型となっているグルコースオキシダーゼは元の酸化型に戻る。また、このようなグルコースの酸化反応と同時に過酸化水素が生成される。このとき、電圧印加回路21により、作用極13と対極14との間に所定の電圧が印加されていると、生成した過酸化水素が電解酸化され、これにより作用極13と対極14との間に過酸化水素の酸化電流が流れる。この酸化電流は、電流測定回路22で測定することができる。この酸化電流の大きさは、生成する過酸化水素量に依存している。したがって、過酸化水素の生成量が被検査液中のグルコース濃度に依存していることから、酸化電流の大きさを測定することにより、被検査液中のグルコース濃度を決定することができる。すなわち、このときの電流の時間変化は、被検査液中の基質であるグルコース濃度に依存して既知の関数に乗る。このため、電流変化を検出すれば基質濃度を測定することが可能となる。

【0010】次に、本実施形態のバイオセンサ11を製造するには、まず、連続多孔質基板12の一方の表面に作用極13を、真空蒸着法、マグネトスバタリング法、スクリーン印刷法、電解メッキ法、無電解メッキ法等により形成する。また、絶縁性樹脂でなる基板15の一方の表面に対極14を形成したものを用意し、対極14と連続多孔質基板12の他方の表面を合わせた後、絶縁膜16と絶縁膜17とを周知の技術を用いて被覆する。なお、対極14、基板15および絶縁膜16の開口部18に相当する部分には、予め切欠を形成しておく。なお、上記した製造方法では、作用極13と連続多孔質基板12、および基板15と対極14を接着剤を用いて接着してもよいし、各部材を束ねて最終的にこれらを保持部材により固定する構成としても勿論よい。

【0011】(実施形態2)図2は、本発明の実施形態2を示している。なお、本実施形態を説明するに当たり、上記実施形態1と同一部分には同一の符号を付してその説明を省略する。本実施形態は、同図(B)に示すように、対極14の連続多孔質基板12に対する占有面

積を小さくし、作用極13の検出部13Bと開口部18の底面との間の部分を境界として対極14が検出部13Bと対向する側に配設されている。なお、対極14の側縁部からは、連続多孔質基板12の側縁に沿って、対極14と同一部材でなる、接続用の幅狭部14Aが延在されている。この幅狭部14Aの端部が配線19と接続されるようになっている。また、連続多孔質基板12における対極14が接していない領域には、図2(A)に示すように開口部18を除いて絶縁層23が対極14と同一の厚さで形成されている。

【0012】本実施形態では、開口部18から導入された被検査液が、連続多孔質基板12を介して作用極13の検出部と対極14との間に迅速に導かれる点では、上記実施形態1と同様であるが、対極14と作用極13との対向する面積が、作用極13の検出部13Bの面積に限定されるため、酵素反応に伴う電流測定の電極面積を厳密に決定することができる。このため、精度の高い基質濃度の測定を行うことができる。

【0013】(実施形態3)図3は本発明の実施形態3を示している。この実施形態を説明するに当たり、上記実施形態1および実施形態2と同一部分には同一の符号を付してその説明を省略する。図3(A)は本実施形態のバイオセンサの要部断面図、図3(B)はバイオセンサの平面図、図3(C)は図3(B)のA-A断面図である。本実施形態のバイオセンサは、図3(A)に示すように、作用極13の検出部13Bに対向する部分の対極14と連続多孔質基板12とが間隙24を介して対向するように設けられていることを特徴としている。

【0014】本実施形態では、連続多孔質基板12と対極14との間にスペーサとしての絶縁層23が介在され、作用極13の検出部13Bに対向する対極14と、連続多孔質基板12との間に間隙24が形成されている。この絶縁層23の形状は、図3(B)に示すように、中央から長手方向の側縁まで切り欠かれた略U字形状であり、対極14、基板15および絶縁膜16に形成された開口部18と、作用極13の検出部13Bとは、平面的に見て絶縁層23の切り欠かれた領域内に位置するようになっている。また、基板15、対極14、連続多孔質基板12、作用極13、絶縁膜16、17は、可撓性を有する材料で構成され、かつ絶縁膜16、17は柔軟性を有する樹脂材料で構成されている。また、同図に示すように、各部材の角部には、丸みが付けられている。このため、本実施形態のバイオセンサを人体、例えばまぶたの下に挿入して検査する場合や、口の中に挿入して検査する場合などに、人体を損傷することなく使用することができる。また、各部材が可撓性を有するため、例えば口の中などで変形させて使用することも可能となる。

【0015】また、本実施形態においては、絶縁層23が介在された対極14と作用極13(幅狭部13A)と

の間には酵素反応に伴う電流が流れにくくなっており、主に作用極13の検出部13Bと対極14との間での過酸化水素の酸化電流を測定することができるため、精度の高い測定を行えるという利点がある。また、連続多孔質基板12と対極14との間の間隙24には、被検査液が毛細管現象により速やかに浸透するため、迅速かつ確実な測定を行うことができる。

【0016】また、連続多孔質基板12及び対極14を洗浄する際、間隙24内に洗浄液が速やかに浸透することができ、開口部18に液が停滞しないので容易に洗浄することができる。以上、各実施形態について説明したが、この発明は、これらに限定されるものではなく、構成の要旨に付随する各種の設計変更が可能である。

【0017】上記各実施形態に用いられる多孔質基板12は、例えば親水化処理したテフロン膜(孔径0.2μm)[商品名:オムニポアメンブレン]にグルコースオキシターゼと牛血清アルブミンの混合溶液を染み込ませ、グルタルアルデヒドで架橋し、テフロン膜の表面及び内部面にグルコースオキシターゼを固定化したものであってもよいし、これに限らなくてもよい。上記各実施形態においては、連続多孔質基板12に固定化される酵素としてグルコースオキシターゼを用いたが、この酵素にメディエータを共存させて固定化した構成としてもよい。このようにメディエータを共存させれば、基質(グルコース)を酸化させて、それ自体が還元された還元型酵素が元の酸化型に戻る際、メディエータが酵素から電子を奪い、還元型メディエータとなる。そして、この還元型メディエータが電極間に生じる反応によって電子を与え、これにより元の酸化型メディエータに戻る。すなわち、酵素とメディエータとを含む多孔質基板中に基質が存在すれば、酵素とメディエータとを仲介して電子が電極に移動し、基質濃度に応じた電流が流れる。したがって、この電流を検出すれば基質濃度を測定することができる。

【0018】このように酵素とメディエータとを多孔質基板中に共存させて固定化すれば、被検査液中に溶存酸素が極少であっても、基質濃度に応じた電流が流れるため、溶存酸素濃度に依存しないで検査測定することができる。また、溶液中のpHを一定にするために開口部内に適量の緩衝溶液を浸しておいても良い。

【0019】上記実施形態では、開口部に対応する部分に作用極の幅狭部が重なっているが、これに限らず、幅狭部が開口部を迂回して形成されてもよい。また、本実施形態では、基質としてのグルコース濃度を測定するためにグルコースオキシターゼを用いたが、測定対象となる基質に応じて各種の酵素あるいは、酵素とメディエータとを固定化する構成としてもよい。

【0020】また、上記各実施形態においては、基板15を有する構成としたが、これを省略しても勿論よい。さらに、対極14や作用極13の形状は、上記各実施形

10

20

30

40

50

態の他に各種の形状とすることが可能であり、要は作用極と対極とが連続多孔質基板を挟んで、または連続多孔質基板と間隙を挟んで設けられ、かつ両電極の対向する位置の近傍に被検査液を導入する開口部を備えている構成であればよい。

【0021】

【発明の効果】以上の説明から明らかなように、この発明によれば、被検査液が微量でも迅速に基質濃度の測定ができるという効果を奏する。また、連続多孔質層内に酵素を固定化しているため、酵素反応を効率的に行わせることができるという効果を有する。さらに、被検査液が微量でも確実に一對の電極間に介在させることができるため、電極間が短くてよく、装置の小型化を図ることができる。また、可撓性や柔軟性を有する材料で各部材を構成することにより、人体に損傷を与えないバイオセンサを実現することができる。

*

*【図面の簡単な説明】

【図1】(A)は本発明の実施形態1の断面図、(B)は実施形態1の平面図。

【図2】(A)は本発明の実施形態2の断面図、(B)は実施形態2の平面図。

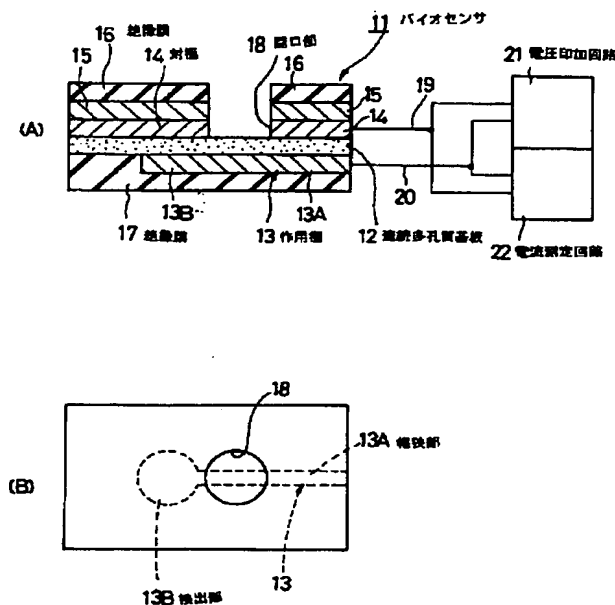
【図3】(A)は本発明の実施形態3の断面図、(B)は実施形態3の平面図、(C)は(B)のA-A断面図。

【図4】従来例の要部断面図。

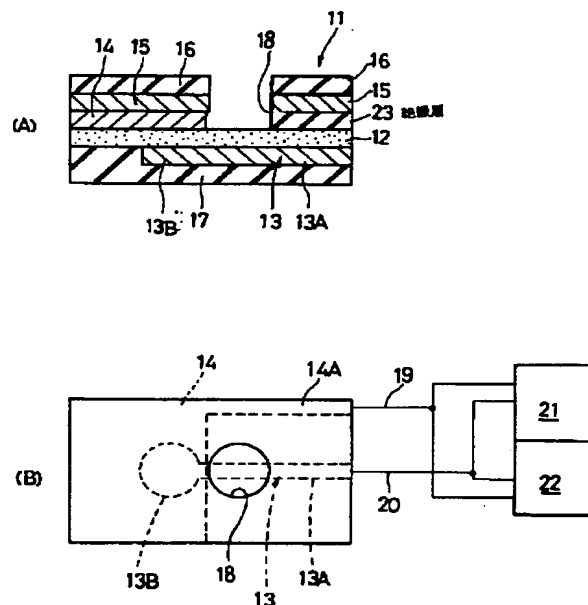
10 【符号の説明】

- 11 バイオセンサ
- 12 連続多孔質基板
- 13 作用極
- 14 対極
- 16、17 絶縁膜
- 18 開口部

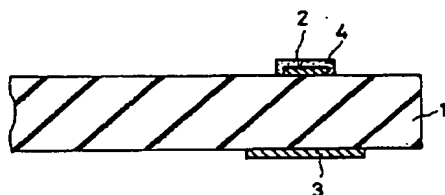
【図1】



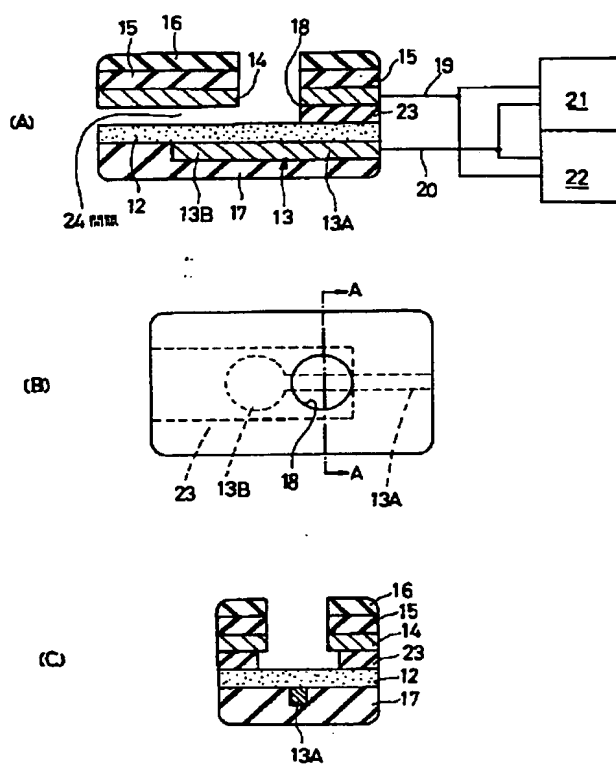
【図2】



【図4】



【図3】



(19) Japanese Patent Office (JP)

(12) Official Gazette for
Kokai Patent Applications
(A)

(11) Japanese Patent Application
Kokai Publication No.:

Hei 9 (1997)-21778

(43) Date of Publication:
January 21, 1997

(51) Int. Cl. ⁸	ID Code	JPO File No.	F1	Tech. Indic.
G 0 1 N	27/327		G 0 1 N	27/30 353R
	27/28 331			27/28 331Z
				27/30 353Z

Examination: Not requested Number of claims: 4 FD (Total of 6 pages)

(21) Application No. : Hei 7 (1995)-194114
(22) Application Date: July 7, 1995

(71) Applicant: 000001443
Casio Computer Co., Ltd.
2-6-1 Nishishinjuku,
Shinjuku-ku, Tokyo

(71) Applicant: 591010619
Yukio Karube
1-3-16 Higashiarima
Miyamae-ku, Kawasaki-shi
Kanagawa-ken

(72) Inventor: Tadahisa Atariyama
Hachioji Research Laboratories
Casio Computer Co., Ltd.
2951-5 Ishikawamachi
Hachioji-shi, Tokyo

(72) Inventor: Yukio Karube
1-3-16 Higashiarima
Miyamae-ku, Kawasaki-shi
Kanagawa-ken

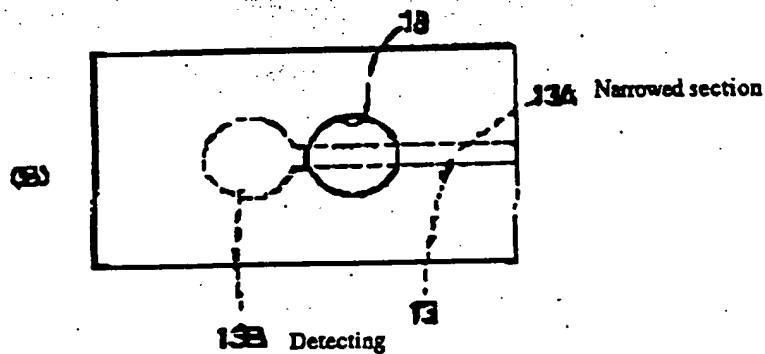
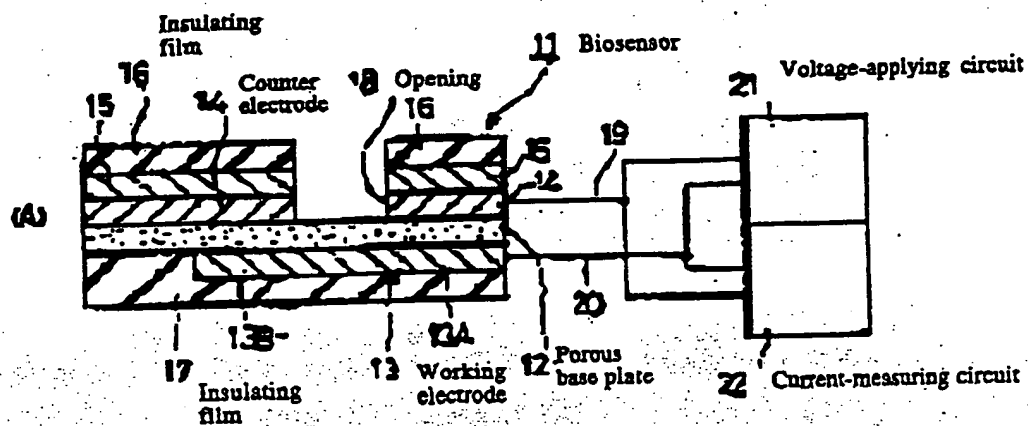
(74) Agent: Jiro Sugimura, Patent Attorney

(54) [Title of the Invention]: Biosensor

(57) [Abstract]

[Object] To realize a compact device that can make a quick measurement of the substrate concentration even when the sample solution is in a small amount.

[Means for Solving the Problems] Provided on one side of a porous base plate 12 is a working electrode 13, and provided on the other side is a counter electrode 14; while formed on the counter electrode 14 is an opening 18. Formed on the outside surface of counter electrode 14 are a base plate 15 and then an insulating film 16. Formed on the other side of the porous base plate 12 and the working electrode 13 and covering the whole surface is an insulating electrode 17. The sample solution introduced from the opening 18 penetrates the continuous porous substrate and enters the area between the working electrode 13 and counter electrode 14 to make possible the measurement of the substrate concentration.



[Claim]

[Claim 1] A biosensor characteristically comprising a pair of electrodes opposing to each other, and a porous layer wherein immobilized on one of its side facing the inside surface of one of the electrodes is an enzyme or an enzyme and a mediator, whereas formed on the side of the other electrode is an opening through which the sample solution to react with the enzyme is to be led to the porous layer.

[Claim 2] The biosensor described in claim 1 characterized by a gap formed between the second electrode and the porous layer so that the sample solution can be introduced from the opening.

[Claim 3] The biosensor described in claim 1 or 2 characterized by insulating layers provided on the outer surfaces of the pair of electrodes facing to each other, and the previously mentioned opening goes through the insulating layer.

[Claim 4] The biosensor described in any one of claims 1 through 3 characterized by the flexibility of the pair of electrodes and the porous layer and by the flexibility and softness of the insulating layers.

[Detailed Explanation of the Invention]

[0001]

[Technical Field] This invention relates to a biosensor. More specifically, this invention relates to an enzyme sensor which uses an immobilized enzyme and the like in clinical tests and water quality tests for determining the concentrations of the components of various solutions.

[0002]

[Prior Art] Shown in Figure 4 is a conventional biosensor with an immobilized enzyme. In this biosensor, a working electrode 2 is provided on one side of an insulating base plate 1, and provided on the other surface is a counter electrode 3. Adhered to the surface of the working electrode 2 is a film of an immobilized enzyme. In the testing operation, the biosensor of this configuration is immersed in the sample solution so that the solution can be present between the two electrodes. This biosensor uses the catalytic action of glucose oxidase during a glucose oxidation so that the glucose concentration can be determined either by oxygen consumption or by hydrogen peroxide increase observed in terms of current changes.

[0003]

[Problem to be solved] However, the above-described conventional biosensor, in which the working electrode and the counter electrode are separated from each other by an insulating base plate 1, needs to be immersed in the sample solution so that the solution can fill the space between the two electrodes. This configuration of the device requires a large amount of sample solution, makes it impossible for the use of this biosensor in the measurement of a small quantity of solution. The object of the present invention is to achieve a compact size of the sensor, and make it possible to measure quickly the concentration of a substrate in a small amount of sample solution.

[0004]

[Solution to the Problem] The invention described in claim 1 is characterized by a porous layer which has an enzyme or an enzyme and a mediator immobilized on its surface that faces the inner surface of one of a pair of electrodes which are facing each other, and an opening provided on a second electrode in such a way that the sample solution to be reacted with the enzyme can be led to the porous layer. The invention described in claim 2 is characterized by the formation of a gap between the second electrode and the porous layer so that the sample solution introduced from the opening can go through the gap. The invention described in claim 3 is characterized by insulating layers provided on the outside surfaces of the pair of electrodes and penetrated by the previously mentioned opening. The invention described in claim 4 is characterized by the flexibility of the pair of electrodes and the porous layer, and by the flexibility as well as softness of the insulating layer.

[0005] In the invention described in claim 1, it is possible to introduce the sample solution from the opening formed on the second electrode side. The sample solution introduced from the opening infiltrates the continuous pores of the porous layer. The porous layer, on which an enzyme is immobilized, ensures the sample solution's undergoing an enzymatic reaction by the enzyme's catalytic action. The sample solution introduced from the opening allows the electric current to pass between the electrodes in accordance with the level of concentration of the substrate if its volume is sufficiently large for filling the gap between the pair of electrodes not occupied by the porous layer. By adjusting the diameter of the continuous pores, it is possible to prevent interfering substances such as proteins from reaching the first electrode (working electrode). In the invention described in claim 2, in which a gap is formed between the second electrode and the porous layer which leads to the opening so that the sample solution can be introduced quickly to the area between the two electrodes. In the invention described in claim 3, the presence of insulating layers on the outside surface of the pair of electrodes facing each other prevents the external electrical effects from reaching the electrodes. In addition, since the opening goes through the insulating layer, it is easy to bring the sample solution from the outside of the insulating layer to the porous layer. In the invention described in claim 4, the insulating layers are both flexible and soft while the pair of electrodes and the porous layer are flexible. The sensor, therefore, is able to prevent the human body from being harmed when the sensor is inserted below an eyelid or in the mouth.

[0006]

[Embodiments] The biosensor of this invention will be explained in detail below with reference to the embodiments illustrated in drawings.

(Embodiment 1) Shown in Figure 1 (A) and (B) is Embodiment 1 of this invention. In Figure 1 (A), 11 represents a biosensor. In biosensor 11, a working electrode 13 is provided on one side of a porous base plate 12. Glucose oxidase, a glucose-oxidizing enzyme, has been immobilized on porous base plate 12. Provided on the other side of porous base plate 12 is a counter electrode 14. Porous base plate 12 is formed by turning a fluororesin like polytetrafluoroethylene into a structure of continuous pores. Glucose oxidase can be immobilized on the organic film on the surface of porous base plate 12 by any of such publicly known methods as the crosslinking method and the entrapment method. In the immobilization process, the blocking of the continuous pores in porous base plate 12 with the organic film can be avoided by continuously feeding an air flow to porous base plate 12 while a glucose oxidase-containing organic film is being adhered to the inside surface of continuous pores.

[0007] On the outside of the counter electrode 14, a base plate 15 and an insulating film 16 have been formed in that order. On the outside of the working electrode 13, an insulating film 17 has been formed so as to cover the working electrode 13 and a porous base plate 12. The above-mentioned base plate 15 and the insulating film 16 should be formed of materials that show a good wettability to the sample solution. The shape of working electrode 13, as its plane view in Figure 1 (B) indicates, consists of a long, narrowed section 13A and a disk-like detecting section with a designated area. Counter electrode 14, covers the whole area of the other side of porous base plate 12 excepting for the opening 18, which is to be described later. Opening 18, through which the sample solution is to be introduced, goes through counter electrode 14, base plate 15, and insulating film 16 in such a way that it will expose porous base plate 12. Opening 18 is formed on a location which, in the plane view, is next to the detecting section 13B of the working electrode 13 provided on the other side of the porous base plate. The edge of narrow section 13A of working electrode 13 and counter electrode 14 are connected with a voltage-applying circuit 21 and a current-measuring circuit 22 via wires 19 and 20.

[0008] In the present embodiment, because narrowed section 13A of working electrode 13 shares a rather small area with counter electrode 14, the measurement of the concentration of substrate in the sample solution essentially occurs on the part of sample solution that is present in the area between detecting section 13B and counter electrode 14. In the measurement of the concentration of the substrate in the sample solution in this setting, the introduction of the sample solution from opening 18 into the area between detecting section 13B and counter electrode 14 occurs very quickly because opening 18 is adjacent to detecting section 13B in the plane view. For this reason, the sample solution can be delivered very

quickly and in a sufficient amount to the area between the two electrodes even when the amount of the sample solution is very small. In addition, the biosensor of this embodiment takes a three-dimensional structure in which the two electrodes face with each other. Because the distance between the two electrodes can be drastically reduced, the whole device can be designed in a small package. The presence of the sample solution between electrodes may be ensured because the sample solution is held within the continuous pores of porous base plate 12 by capillary action. This sensor, therefore, makes it possible to measure the concentration of glucose in the sample solution while the sample solution is between the two electrodes. Furthermore, the enzyme immobilized on the surface of the continuous pores of porous base plate 12 in this embodiment substantially increases the contact area between the enzyme and the sample solution, thus making the enzyme reaction and measurement more efficient. By setting the diameter of continuous pores in such a size that high molecular weight substances like proteins which could act as interfering substance in the measurement of substrate can be prevented from reaching working electrode 13. In this manner, a high efficiency measurement of hydrogen peroxide and the like, which are generated by the immobilized enzyme, becomes possible.

[0009] In the measurement of the concentration of glucose in such sample solutions as blood, urine, saliva and tears, first, a small amount of sample solution is dropped in opening 18. When the sample solution infiltrates into the continuous pores of porous base plate 12, glucose in the sample solution is oxidized by glucose oxidase immobilized in the continuous pores. In the process, glucose oxidase is reduced to become the reduced type. If oxygen is present in the sample solution or in a liquid that is present with the sample solution, the oxygen acts as electron receptor, turning the reduced type glucose oxidase back to the oxidized type. Simultaneous with this glucose oxidizing reaction, hydrogen peroxide is produced. If a certain level of voltage is applied from voltage-applying circuit 21 to the area between working electrode 13 and counter electrode 14, the produced hydrogen peroxide is electrolytically oxidized, and oxidation current flows between working electrode 13 and counter electrode 14. The oxidation current can be measured with current measurement circuit 22. The oxidation current depends on the quantity of the produced hydrogen oxide. Because the quantity of hydrogen oxide produced depends on the glucose concentration in the sample solution, the glucose concentration in the sample solution can be determined by measuring the oxidation current. In short, the change with time of current in this process depends on the concentration of glucose, which is the substrate in the sample solution, conforming with an already established function. For this reason, the substrate concentration can be measured by detecting the change in current.

[0010] The preparation of the biosensor 11 of the present embodiment is carried out as follows. First, working electrode 13 is formed on one surface of porous base plate 12 by any of such methods as vacuum deposition, magnet sputtering, screen printing, electrolytic plating, and electroless plating. Separately, a counter electrode is formed on one side of a base plate 15, which is composed of an insulating resin. Then the counter electrode 14 is attached to a second surface of porous base plate 12. Next, with an already available technique, the surfaces are covered with insulating film 16 and insulating film 17. Portions of

counter electrode 14, base plate 15 and insulating film 16 corresponding to opening 18 should be cut out beforehand. In the above-described preparation process, working electrode 13 and porous base plate 12, and base plate 15 and counter electrode 14 may be adhered together with an adhesive. As another alternative, those composing members may be put together to be finally fixed into a unit with a holding device.

[0011] (Embodiment 2) Illustrated in Figure 2 is Embodiment 2 of the present invention. In explaining this embodiment, the same reference numerals as those used in explaining Embodiment 1 will be used without further explanation if these devices share corresponding parts. In this embodiment, as shown in Figure 2(B), counter electrode 14 occupies less area on porous base plate 12. Although it still faces the detecting section 13B, it ends at the borderline between the bottom of opening 18 and detecting section 13B. Counter electrode 14, however, has a strip of the same material extending on one of its side so that it will serve as a connecting section. This strip, which is narrowed section 14A, is connected at its end with wire 19. On the part of porous base plate 12 which is not in contact with counter electrode 14, an insulating layer 23, which is as thick as counter electrode 14, is formed excepting for the area for the opening 18.

[0012] This embodiment is the same as Embodiment 1 as long as the sample solution introduced from opening 18 is made to flow through porous base plate 12 so as to reach quickly the area between the detecting section of working electrode 13 and counter electrode 14. However, this embodiment, in which the overlapping of counter electrode 14 and working electrode 13 is limited to the area of detecting section 13B of working electrode 13, it is possible in this embodiment to determine precisely the electrode area for the measurement of current generated by the enzyme reaction. This embodiment, therefore, is capable of a high precision measurement of the substrate concentration.

[0013] (Embodiment 3) Illustrated in Figure 3 is Embodiment 3 of the present invention. In explaining this embodiment, the same reference numerals as those in Embodiment 1 and Embodiment 2 will be used without further explanation if the device have the corresponding parts. Shown in Figure 3(A) is a cross sectional diagram of the main body of the biosensor based on the present embodiment. Shown in Figure 3(B) is the plane view of the biosensor, and shown in Figure 3(C) is the cross section of Figure 3(B) cut along A—A plane. The biosensor of this embodiment is characterized by a configuration in which portions of counter electrode 14 and porous base plate 12, which face detecting section 13B of working electrode 13, face each other, having an intermediate gap 24 in between.

[0014] In this embodiment, an insulating layer 23 is made to be present as spacer between porous base plate 12 and counter electrode, while a gap 24 is made to be present between counter electrode 14, which faces detecting section 13B of working electrode 13, and porous base plate 12. Insulating layer 23 is shaped to an approximate U-shape by cutting out an area extending longitudinally from the center to one of the edges as shown in Figure 3(B). In the plane view, opening 18, which is formed on counter electrode 14, base plate 15, and insulating film 16, and detecting section 13B of working electrode 13 are both within the above-mentioned cut-out area. Base plate 15, counter electrode 14, porous base plate 12,

working electrode 13 and insulating films 16 and 17 are formed of flexible materials. The material for insulating films 16 and 17 should be a resin not only flexible, but also soft. In addition, those members of the sensor are rounded at the corners and edges as shown in Figure 3 so that the biosensor of the present embodiment, being inserted below the eyelids or into the mouth for the purpose of measurement, will not harm the human body. The flexibility of the materials allows the use of the sensor in a deformed state in the mouth.

[0015] In this embodiment, the current generated in the enzyme reaction is difficult to run through the area between counter electrode 14 and working electrode 13 (narrowed section 13A). In this manner, the hydrogen peroxide oxidation currents measured is limited to the area between detecting section 13B of working electrode 13 and counter electrode 14, making it possible to perform a high precision measurement. In addition, a quick and accurate measurement can be performed because of a quick capillary infiltration of the sample solution to gap 24 between porous base plate 12 and counter electrode 14.

[0016] The washing of porous base plate 12 and counter electrode 14 can be performed easily because the cleaning solution can infiltrated into gap 24 without staying in opening 18. The embodiments having been explained so far do not limit the scope of the present invention. The designs accompanying the main points of this invention's constitution may be changed variously.

[0017] The porous base plate 12 to be used in the above embodiments may be prepared by a process comprising the absorption of a mixed solution of glucose oxidase and bovine serum albumin absorbed by a hydrophilized Teflon film (pore size 0.2 μm) [trade name: Ominipore Membrane], the crosslinking of them by glutaraldehyde, and the immobilization of glucose oxidase. However, the method is not limitative and alternative methods may be adopted. In the embodiments explained above, glucose oxidase was used as the enzyme to be immobilized on porous base plate 12. However, this enzyme may be immobilized together with a mediator. During the return of the reduced type enzyme (which has been reduced by having glucose substrate oxidized) to the oxidized type, the mediator coexisting with enzyme in the immobilized state will capture electrons from the enzyme to become a reduced type mediator. This reduced type mediator will then give electrons in the reaction between electrodes to return to the original oxidized type mediator. In short, the presence of a substrate in a porous base plate which contains an enzyme and a mediator will act as a medium which causes the transfer of electrons between electrodes, thus allowing the flow of currents in accordance with the substrate concentration. Therefore, by detecting the current, the substrate concentration can be determined.

[0018] As described above, the immobilization of coexisting enzyme and mediator allows the flow of current in accordance with the substrate concentration level even the presence of the dissolved oxygen is very small. In this manner, the testing and measurement of substrate concentration not depending on the dissolved oxygen concentration is made possible. In order to keep the pH of the solution at a constant level, a suitable amount of a buffer solution may be kept in the opening.

[0019] In the embodiments described above, the narrowed section of the working electrode

is overlapped by the opening. In some alternative embodiments, the narrowed section of the working electrode may go around the opening. Although glucose oxidase is used in the above-described embodiments for the measurement of the concentration of glucose as substrate, various other enzymes as well as combinations of them with mediators may be immobilized and employed depending on the types of substrates to be measured.

[0020] Furthermore, base plate 15, which is used in the configurations of the above embodiments, may naturally be omitted. In addition, counter electrode 14 and working electrode 13 may take various optional shapes as long as the configuration remains to have a porous base plate sandwiched between the working electrode and the counter electrode, and an opening located near the area where the two electrodes face each other.

[0021]

[Advantages of the Invention] As the explanation above has clearly revealed, the present invention has an advantage of making possible a quick measurement of substrate concentration even with a very small amount of the sample solution. With the enzyme immobilized within a porous layer, it is possible to perform an efficient enzyme reaction. In addition, because the distance between the two electrodes may be small, and because the sample solution can be placed exactly between a pair of electrodes even when its amount is small, a compact device design becomes possible. Furthermore, the device, whose components are formed with materials flexible and soft, can realize a biosensor that will not harm the human body.

[Brief Description of Drawings]

[Figure 1] (A) shows a cross section of Embodiment 1 of this invention; (B) is a plan of Embodiment 1.

[Figure 2] (A) shows a cross section of Embodiment 2 of this invention; (B) is a plan of Embodiment 2.

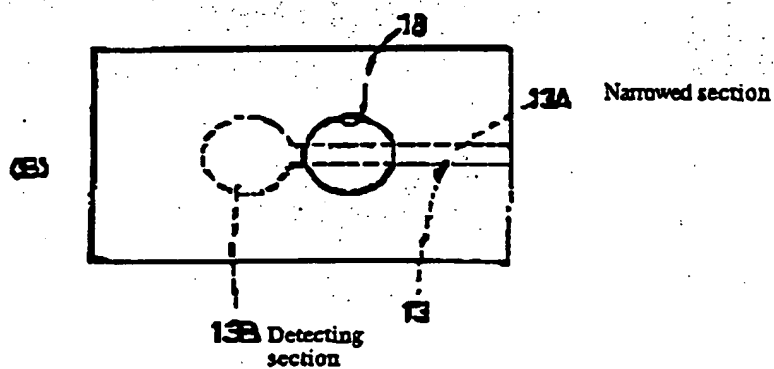
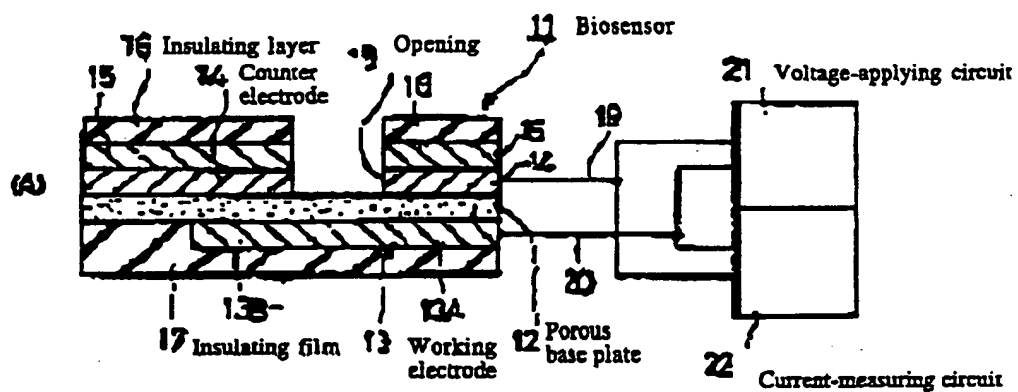
[Figure 3] (A) shows a cross section of Embodiment 3 of this invention; (B) is a plan of Embodiment 3; and (C) is a cross section of the device cut along A—A plane.

[Figure 4] The cross sectional diagram of the main body of a conventional biosensor.

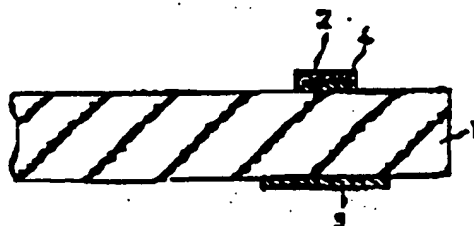
[Explanation of Reference Numerals]

- 11 Biosensor
- 12 Porous base plate
- 13 Working electrode
- 14 Counter electrode
- 16, 17 Insulating films
- 18 Opening

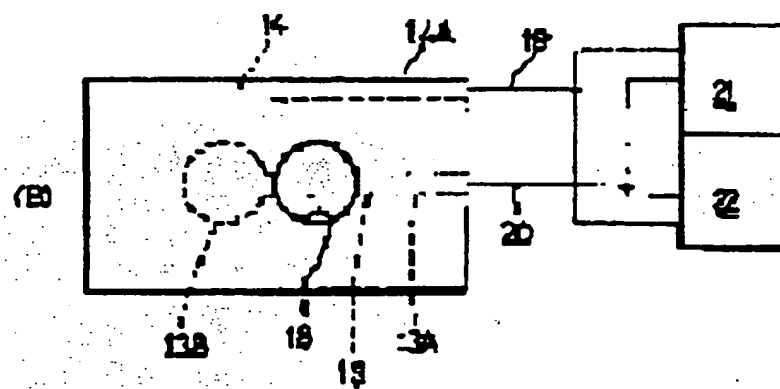
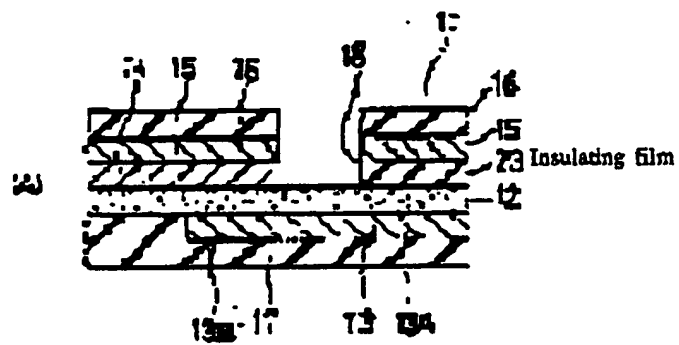
[Figure 1]



[Figure 4]



[Figure 2]



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.